UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1925-1926 N° 15

CONTRIBUTION
A LA
RECHERCHE DES NITRATES
AU POINT DE VUE BIOCHIMIQUE

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

présentée et soutenue le juillet 1926

PAR

SALAH KAVAKIBI

Né à Alep, le 16 mars 1901
Pharmacien de 1re classe de l'Université Arabe
de Damas (Syrie)

JURY : MM. GUERBET, *Président.*
BOUGAULT, *Professeur.*
DAMIENS, *Agrégé.*

PARIS

IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE
JOUVE & Cie, ÉDITEURS
15, RUE RACINE, 15

1926

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1925-1926 N° 15

CONTRIBUTION
A LA
RECHERCHE DES NITRATES
AU POINT DE VUE BIOCHIMIQUE

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU DIPLÔME DE

Docteur de l'Université de Paris

(PHARMACIE)

présentée et soutenue le juillet 1926

PAR

SALAH KAVAKIBI

Né à Alep, le 16 mars 1901
Pharmacien de 1re classe de l'Université Arabe
de Damas (Syrie)

JURY
MM. GUERBET, *Président.*
BOUGAULT, *Professeur.*
DAMIENS, *Agrégé.*

PARIS

IMPRIMERIE DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE
JOUVE & Cie, ÉDITEURS
15, RUE RACINE, 15

1926

Personnel de la Faculté de Pharmacie

ADMINISTRATION

MM. RADAIS, *Doyen*, O. ✻, ✪ I.
PERROT, *Assesseur*, O. ✻, ✪ I.
G. DURSENT, *Secrétaire*, ✻, ✪ I.

PROFESSEURS

MM.	GUIGNARD, Membre de l'Institut, C. ✻, ✪ I.	Botanique Générale.
	H. GAUTIER, O. ✻, ✪ I.	Chimie minérale.
	RADAIS, O. ✻, ✪ I	Cryptogamie et Microbiologie.
	BÉHAL, Membre de l'Institut, C. ✻, ✪ I. .	Chimie organique.
	PERROT, O. ✻, ✪ I.	Histoire Naturelle des Médicaments.
	COUTIÈRE, ✻, ✪ I.	Zoologie.
	BERTHELOT, Membre de l'Institut, ✪ I. .	Physique.
	GRIMBERT, ✻, ✪ I.	Chimie biologique.
	LEBEAU, O. ✻, ✪ I.	Pharmacie chimique.
	DELÉPINE, O ✻, ✪ I	Hydrologie et Hygiène.
	GUERBET, ✻, ✪ I.	Toxicologie.
	BOUGAULT, ✻, ✪ I.	Chimie analytique.
	GORIS ✻, ✪ I.	Pharmacie galénique.

Doyens honoraires : MM. GUIGNARD, C. ✻, ✪ I. et H. GAUTIER, O. ✻, ✪ I.
Professeurs honoraires : M. MOUREU, G. O. ✻, ✪ I. et A. VILLIERS, ✻, ✪ I.

CHARGÉS DE COURS

MM.	TASSILLY, ✻, ✪ I.	Minéralogie.
	MARC HONNORAT, ✻, ✪ I.	Législation et Déontologie pharmaceutiques.
	LUTZ, ✻, ✪ I	Cryptogamie.
	GUÉRIN, ✻, ✪ I.	Botanique.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. SOMMELET, ✻, ✪ I.
DAMIENS, ✪ I.
TASSILLY, ✻, ✪ I.

MM. GUÉRIN, ✻, ✪ I.
LUTZ, ✻, ✪ I.
LAUNOY, ✻, ✪ I.

MM. HÉRISSEY, ✻, ✪, I.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM.	DEFACQZ, ✻, ✪ I.	Chimie générale.
	COUSIN, ✻, ✪ I.	Chimie analytique.
	SOUÈGES, ✪ I.	Micrographie.
	LEROUX, ✪ I.	Physique.
	DEVAL, ✪ I.	Microbiologie.
	FRANÇOIS, ✻, ✪ I.	Travaux généraux de 4e année.

Bibliothécaire en Chef : M. BEAULIEUX, ✪ I.

A MON MAITRE

MONSIEUR ABDUL VAHAB KANAVATI

Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie
de l'Université Arabe de Damas (Syrie)

En témoignage de mon affection la plus profonde.

A MON MAITRE

MONSIEUR GUERBET

Professeur de la Faculté de Pharmacie de Paris

Hommage de vive reconnaissance pour avoir bien voulu m'honorer en acceptant la présidence du Jury lors de la soutenance de cette thèse, ainsi que des conseils éclairés qui m'ont permis de mener ce travail à bonne fin.

A MON MAITRE

MONSIEUR E. KOHN-ABREST

Docteur ès Sciences
Directeur du Laboratoire de Toxicologie de Paris

Avec toute ma reconnaissance d'avoir bien voulu m'accueillir dans son laboratoire et me donner le sujet de cette thèse et m'avoir guidé dans les détails de son exécution.

CONTRIBUTION

A LA

RECHERCHE DES NITRATES

INTRODUCTION

L'organisme humain, ne renfermerait pas normalement de nitrates (1), leur présence dans les aliments n'a guère été signalée, bien qu'elle l'ait été dans certains végétaux (bourrache, pariétaire, chiendent, etc...).

On a constaté parfois des quantités élevées de nitrates, 2 à 3 grammes pour 1.000 dans des betteraves fourragères sous l'influence des engrais nitratés.

D'autre part, au point de vue biologique, l'action des nitrates n'est pas très bien définie. On leur attribue des actions diurétiques (poudre de Dower, poudre des Voyageurs), leur toxicité paraît faible, l'ingestion de quantités notables, 5 à 10 grammes d'azotate de potassium ne produit en général pas d'accident, mais à doses plus élevées, surtout en

1. Ogier et Kohn-Abrest, *Traité de Chimie Toxicologique*, t. II, p. 12

solution concentrée, les nitrates, notamment le nitrate de potassium détermine des troubles gastro-intestinaux. L'intoxication chronique a été observée à la suite d'une administration trop prolongée de nitrate de potassium comme médicament.

La consommation de charcuterie salpêtrée à 1 pour 1.000, ne paraît pas produire d'accidents, mais en somme nous ignorons quelle peut être sur l'organisme l'action de très petites doses de nitrate pris quotidiennement pendant des temps très prolongés.

Les procédés de recherche et de dosage des nitrates sont assez faciles, lorsqu'il s'agit de quantités relativement considérables ; ils cessent de l'être dans les autres cas.

Il est très difficile, sinon impossible, d'isoler à l'état de pureté les nitrates incorporés à des matières organiques, d'où impossibilité dans la plupart des cas d'employer les procédés classiques permettant le dosage, ou même les procédés colorimétriques (diphénylamine, etc...).

C'est ainsi que l'attaque des nitrates par le cuivre et l'acide sulfurique, n'offre pas dans des milieux complexes suffisamment de sensibilité. Le procédé de Schloesing appliqué couramment dans les stations agronomiques, consistant dans la transformation de l'acide azotique des nitrates, en bioxyde d'azote par attaque au chlorure ferreux et à l'acide chlorhydrique, puis mesure du bioxyde dégagé, est un moyen très simple et très rapide pour doser

les nitrates ; mais il manque également de sensibilité lorsqu'il s'agit de l'appliquer en chimie biologique. D'autres procédés où les nitrates sont transformés en sels ammoniacaux (Kjeldahl, Devarda (1) sont la plupart d'une réaction trop longue ou trop délicate.

C'est sans doute en raison de ces difficultés que la question des nitrates en chimie biologique est relativement peu étudiée.

Aussi était-il intéressant pour la reprendre de pouvoir disposer d'un procédé de dosage simple et probant.

On sait que lorsqu'on agite avec du mercure, un mélange d'acide sulfurique et nitrique, ou d'acide sulfurique et d'un nitrate, le mercure est attaqué, avec dégagement de bioxyde d'azote.

Cette réaction bien connue et classique appliquée par Lunge est d'usage courant dans les poudreries pour le dosage des nitrocelluloses (2).

M. Kohn-Abrest et M. le Professeur Wahl l'ont appliqué dernièrement (3) au dosage de la soie artificielle *non dénitrée*, dans les tissus en soie Chardonnet.

Enfin, M. Kohn-Abrest, après l'avoir rendue suffisamment sensible et adaptée spécialement, nous a proposé de l'employer en chimie biologique.

1. *Ann. Ch. analytique*, 1913, p. 45.
2. Critiqué par Marqueyrol et Florentin, *Annales de Chimie analytique*, 1911, p. 345.
3. Kohn-Abrest et Wahl, Rapport d'expertise, 1916, M. Glard juge d'instruction.

Nous avons donc effectué par le procédé de M. Kohn-Abrest une série de recherches des nitrates dans des végétaux, des aliments essentiels, dans des produits de charcuterie, enfin nous l'avons appliquée en toxicologie.

Nos recherches, qui ne sauraient traiter dans son ensemble la question des nitrates en biochimie, apportent pensons-nous, une contribution utile à cette question.

Elle nous a permis de donner quelques précisions en ce qui concerne la présence des nitrates dans l'organisme ; et de disposer pour les recherches des nitrates en chimie végétale d'un procédé susceptible d'applications pratiques, notamment dans les stations agronomiques.

Nous exprimons encore en terminant cette introduction toute notre gratitude à nos Maîtres dont la Science éprouvée et l'expérience, nous ont permis d'effectuer nos recherches.

Nous adressons tout particulièrement à M. Kohn-Abrest l'inspirateur de cette thèse, tous nos remerciements, et nous ne pouvons oublier non plus la sympathie que nous ont témoigné ses collaborateurs lors de notre court passage au Laboratoire de Toxicologie.

Nous avons donné à ce travail l'ordre suivant :

Chapitre premier. — *Procédés de dosage des nitrates.*
Chapitre II. — *Procédé adapté au dosage des nitrates en chimie biologique.*

CHAPITRE III. — *Applications pratiques. Nitrates dans le lait, dans les végétaux, les aliments et dans les organes.*

CHAPITRE IV. — *Recherche des nitrates en toxicologie.*

CONCLUSIONS.

CHAPITRE PREMIER

Caractères des azotates (1).

Une solution d'un nitrate chauffée avec du cuivre et un peu d'acide sulfurique fournit un dégagement de vapeurs nitreuses, faciles à reconnaître à leur couleur et à leur odeur.

Une trace faible d'un nitrate, mélangé de sulfate ferreux et d'acide sulfurique concentré, donne une coloration variant du rose sale au brun lilas ; cette réaction purement qualitative est très sensible.

Une solution d'un nitrate, additionnée de quelques gouttes d'acide sulfurique, donne avec la brucine une coloration rouge intense.

Le sulfate d'aniline donne une coloration rouge avec l'acide azotique libre.

Les azotates en présence de l'acide sulfurique et du phénol donnent de l'acide picrique, dont la coloration jaune est plus appréciable par addition ultérieure d'ammoniaque ; mais cette réaction n'est pas spécifique, elle est applicable aussi aux azotites.

Une solution d'un nitrate, mélangée avec une solu-

1. Ogier et Kohn-Abrest, *Traité de toxicologie*, t. II, p. 12.

tion de diphénylamine et additionnée d'acide sulfurique, fournit une coloration bleue (1).

Le nitrate chauffé avec de l'acide sulfurique décolore l'indigo.

Une autre réaction qualitative de l'acide azotique en présence de l'acide azoteux a été signalé par W. Iwanow (*Pharm. Zeit.*, 1913, p. 209).

L'auteur emploie comme réactif une solution d'iridium tétravalent dans l'acide sulfurique concentré : on prend 0,025 d'iridium sous la forme d'oxyde qu'on échauffe jusqu'à décoloration avec 5 centimètres cubes d'eau et 100 centimètres cubes d'acide sulfurique concentré. La substance à essayer doit être sèche — une partie mise en contact avec 5 centimètres cubes du réactif chaud donne une coloration bleue — assez fugace. La réaction se fait mieux dans un courant d'acide carbonique.

Dosage des nitrates. — Pour doser l'acide azotique combiné, Denigès (2) a recours aux quatre réactions suivantes (M, étant un métal alcalin) :

A. — $AzO^3M + 3\,FeCl^2 + 4\,ClH = AzO + 3\,FeCl^3 + 2\,H^2O + MCl$

B. — $AzO^3M + 8\,H + SO^4H^2 = AzH^3 + SO^4MH + 3\,H^2O$

C. — $AzO^3M + AzH^4Cl = MCl + 2\,H^2O + Az^2O$

D. — $2\,AzO^3M + 3Hg + 4\,SO^4H^2 = 2\,AzO + 3\,SO^4Hg + 4H^2O + SO^4M^2$

1. La solution de sulfate de diphénylamine se prépare comme suit: dans un flacon on met 1 à 2 grammes de ce sel et 50 centimètres cubes d'eau, on agite et on verse peu peu à 50 centimètres cubes de SO^4H^2 pur.

2. G. Denigès, *Précis de Ch. analytique*, 5e édit., 1920, p. 736.

A.—La première équation appliquée par Pelouze montre que l'on peut utiliser pour le dosage de l'azote nitrique la transformation en sel ferrique d'une quantité de sel ferreux proportionnelle à la quantité de nitrate (procédé Pelouze).

Le principe est le suivant : l'acide azotique du nitrate réagit sur le protochlorure de fer en le transformant en peroxyde avec dégagement de bioxyde d'azote. On dose par le permanganate de potasse le fer restant à l'état de protochlorure, ce qui permet de calculer l'acide azotique.

Schloesing a modifié ce procédé en le rendant applicable en présence de matières organiques (procédé classique en chimie agricole). Le bioxyde d'azote formé est mesuré et le volume comparé à celui que donne une même quantité de nitrate parfaitement pur, le rapport entre les deux volumes donnant la proportion de nitrate contenu dans le produit essayé.

B. — La méthode de Devarda, appliquant la réaction B est utilisée pour le dosage de l'azote dans les nitrates métalliques, elle a été appliquée par M. Koehler (1), Marqueyrol et Jovinet au dosage de l'azote dans les nitro-celluloses.

On dissout un poids déterminé de nitro-cellulose dans la lessive de potasse additionné d'eau oxygénée ; le produit nitré et saponifié sans formation de trace d'azote libre ou d'ammoniaque. On ajoute à la

1. Koehler, Marqueyrol et Jovinet, *Dosage de l'azote dans le nitrocellulose* (*Ann. Ch. anal.*, 1913, p. 45).

solution un peu d'alliage de Devarda (aluminium 45 cuivre 50, zinc 5) finement pulvérisé et tamisé et après réduction de l'azote nitrique en azote ammoniacal, on distille l'ammoniaque dans un excès d'acide titré.

La nitro-cellulose employée donnait :

212,25 par ce procédé ;

213,4 par la méthode nitrométrique ;

211,6 par la méthode de Kjeldahl.

Cette dernière méthode de Devarda est la plus précise ; toutefois son exécution est assez difficultueuse et c'est pourquoi nous lui avons préféré la méthode nitrométrique.

C. — L'équation C est appliquée par Joulie.

Quand on chauffe un mélange de nitrate alcalin et de chlorhydrate d'ammoniaque, le nitrate est transformé en chlorure. On chauffe le mélange jusqu'à volatilisation complète de l'excès de chlorhydrate d'ammoniaque, le chlorure alcalin reste comme résidu. On peut donc par un dosage de chlore, calculer la proportion de nitrate contenu dans l'échantillon analysé.

D. — L'action du mercure sur les composés nitriques en présence de SO^4H^2 est utilisée pour le titrage des azotates commerciaux.

Les appareils servant à la mesure du dégagement gazeux sont classés par Denigès en deux séries. Dans l'une le générateur gazeux et le récipient mesureur sont réunis, dans l'autre ils sont séparés.

Parmi ceux de la première catégorie, le plus

employé est le nitromètre de Lunge (1) qui utilise la réaction D.

Il consiste essentiellement en deux vases cylindriques R et C, allongés communiquant par leur extrémité inférieure au moyen d'un tube de caoutchouc très résistant (fig. 1).

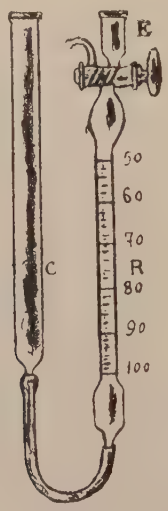

Fig. 1

Le récipient R est gradué au cinquième de centimètre cube et porte supérieurement un entonnoir E; à l'aide d'un robinet à trois voies on peut faire communiquer R avec E ou avec l'air extérieur, ou l'obturer complètement.

Quant à C, il est destiné selon qu'on l'élève plus ou moins à établir l'égalité de pression du contenu gazeux de R avec celle de l'atmosphère et à permettre l'introduction de la substance à doser dans R

1. Denigès, *Précis de Chimie anal.*, 1920, p. 345 et suiv.

en réduisant momentanément la pression dans ce tube. Les deux récipients renferment du mercure.

Le récipient R porte deux renflements permettant de recueillir un volume assez considérable de gaz (100 cent. cubes).

Dans le cas où le dégagement gazeux doit s'effectuer à l'ébullition continue, il est nécessaire de chasser l'air du récipient par la vapeur d'eau, avant

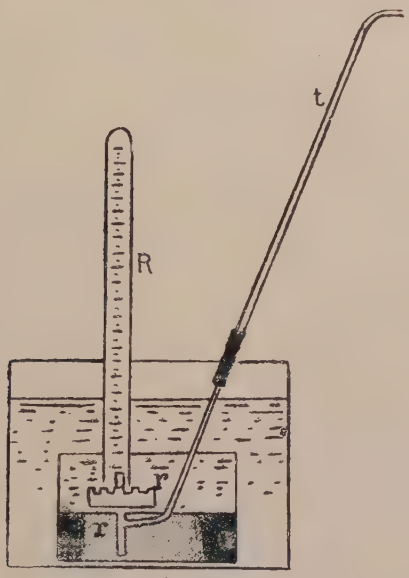

Fig. 2

de recueillir dans une éprouvette le gaz produit. On opère alors dans un ballon à distillation dans le vide, en se servant pour éviter le reflux du liquide du récepteur.

Un tube *r* (fig. 2) est engagé dans un disque de liège assez large portant sur le dessus quatre petites

échancrures radiales. Le tube, par une soudure latérale, est relié au générateur par une tubulure mince et longue (80 cent. de long).

Le tube *r* plonge dans un petit cristallisoir rempli de mercure en quantité suffisante pour masquer la soudure, mais sans atteindre le dessus du disque de liège, le tout est placé dans une cuve d'eau. Quand, par ébullition, on a chassé l'air de l'appareil et qu'on veut recueillir le gaz à mesurer, on place sur l'orifice supérieur de *r* une éprouvette graduée remplie d'eau (ce dispositif est dû à de Koninck).

On introduit dans cette éprouvette R par le jeu d'un robinet et un abaissement convenable du tube manométrique, le produit à essayer, dissout dans l'acide sulfurique concentré. On agite constamment le mercure du tube mesureur pour empêcher un échauffement trop considérable, dangereux pour l'appareil. Cela fait, ce même tube est incliné presque horizontalement, afin de mettre la solution en contact avec une grande surface de mercure, puis on le redresse brusquement et ainsi de suite, à plusieurs reprises, afin de produire une sorte de mélange de mercure avec le liquide acide. Sous l'influence de l'azote nitrique en milieu sulfurique, le mercure est attaqué à froid, il se forme du sulfate mercurique et dégagement de bioxyde d'azote. La totalité de l'azote étant dégagée, il faut l'amener à la pression atmosphérique pour effectuer la lecture du volume gazeux. Pour cela on règle la hauteur du tube d'équilibre de façon que le mercure soit au même

niveau de part et d'autre, puis, pour contrebalancer l'influence de la colonne acide, on verse quelques centimètres cubes de SO^4H^2 concentré dans l'entonnoir et on ouvre très légèrement le robinet : une partie de l'acide passe dans le tube mesureur. On abaisse alors, très délicatement, le tube de niveau, jusqu'à ce que, à une ou deux gouttes près, le reste de l'acide soit également descendu dans la burette : à ce moment, il y a équilibre de pression dehors et dedans. On fixe le tube de niveau dans cette position, on ferme le robinet, on attend que l'acide qui mouille les parois soit descendu et on lit le volume V occupé par l'oxyde nitrique. On prend note en même temps de la température θ degrés et de la pression H. Le poids P du gaz est donné par la formule :

$$P = \frac{V.H. \times 1 \text{ mgr}, 341}{760 \times (1 + 0{,}00367\,\theta)}$$

Le poids correspondant du nitrate, d'équivalent E, est :

$$P \times \frac{E}{30}$$

Dans les poudreries on calcule différemment. On mesure le volume de bioxyde d'azote dégagé, on calcule l'azote qu'il renferme.

Mais quelle que soit la méthode choisie, il est indispensable lorsqu'il s'agit de rechercher des nitrates incorporés à des matières organiques, d'éliminer autant que possible ces dernières. Aussi doit-on procéder à des purifications préalables point

toujours faciles et totales. Malgré tous les soins employés à cet effet on risque de voir échapper les faibles quantités de nitrates dont la recherche est précisément importante en chimie biologique. Aussi était il nécessaire à cet effet d'instituer une méthode spéciale que nous décrivons ci-après.

CHAPITRE II

Recherche des nitrates en chimie biologique procédé de Kohn-Abrest et Salah Kavakibi

La réaction mise en œuvre est celle décrite par Lunge.

Lorsqu'on agite avec du mercure un mélange d'acide sulfurique et d'acide azotique, ou de nitrate,

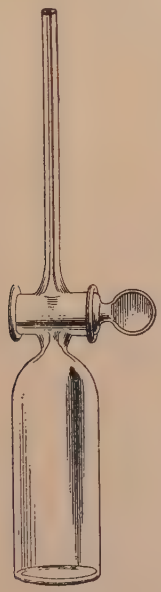

Fig. 3

le mercure est attaqué avec dégagement de bioxyde d'azote :

$$2\,NO^3H + 3\,SO^4H^2 + 3\,Hg = 2\,NO + 3\,SO^4Hg + 4H^2O.$$

Pour appliquer cette réaction aux cas qui nous occupent, le nitromètre n'est pas indispensable, si l'on dispose d'une cuve à mercure ordinaire, et de quelques éprouvettes à robinet du modèle de M. Kohn-Abrest (1) (fig. 3) (tige semi-capillaire et longue, cloche de 50 à 70 cmc.). On peut ainsi mener à peu de frais plusieurs dosages de front.

Nous considérons deux cas :

A. *Corps solides.* — Si le corps est *solide* on en prélève 25 grammes que l'on divise et met en macération dans 100 centimètres cubes d'eau additionnée de carbonate de soude, de manière que le milieu soit légèrement alcalin.

On essore et on lave ; on porte à ébullition pendant quelques minutes après avoir ajouté du sous-acétate de plomb (de 1 à 10 %). On filtre, on lave, on élimine l'excès de plomb par le carbonate de soude. On filtre à nouveau et après neutralisation par l'acide acétique on concentre par ébullition sous pression réduite dans un ballon, chauffé au moyen d'un bain d'eau vers + 70 degrés environ. Le dispositif est très simple, un ballon à rectification ordinaire, d'environ 150 centimètres cubes bouché par du liège et dont le tube latéral communique avec une trompe à eau, l'opération prend environ une demi-heure.

Le ballon est alors plongé dans l'eau froide, le résidu est attaqué par 8 centimètres cubes d'acide

1. Ce cliché nous a été prêté par la Maison Gaston Doin, Editeur, 8, Place de l'Odéon, nous la remercions sincèrement de son obligeance.

sulfurique à 66 degrés Baumé, on laisse en contact pendant une demi-heure en maintenant le refroidissement (qui a pour but d'empêcher le dégagement des composés chlorés qui pourraient résulter de l'acion de l'acide sulfurique sur le mélange des chlorures et des azotates) et on introduit le produit qui est fluide, dans une éprouvette à robinet à longue tige semi-capillaire préalablement remplie de mercure et surmontée d'un entonnoir amovible par un joint en caoutchouc.

On rince le ballon et l'entonnoir avec 5 centimètres cubes d'acide sulfurique à 58 degrés Baumé (75 0/0), obtenu d'après la formule :

Eau distillée.....	60 cmc.
Acide sulfurique 66° Baumé....	135 cmc.

et l'on agite énergiquement l'éprouvette pendant dix minutes sur la cuve à mercure. Quand le gaz est rassemblé, on le transvase dans une éprouvette graduée dont la partie supérieure plus étroite est divisée en 1/20 de centimètre cube. On mesure et on vérifie la nature du gaz en l'agitant avec une solution saturée aqueuse de sulfate ferreux (1) (pour de petits volumes 1 cm.c. à 2cm.c. suffisent). Le réactif brunit instantanément et absorbe intégralement le gaz. On n'a jamais constaté la présence d'acide carbonique ni de chlore, peut-être existe-t-il des traces d'oxygène absorbable par l'hydrosulfite de soude. Il reste

1. Le réactif est introduit sous le mercure par une pipette courbe.

parfois un résidu gazeux constitué par de l'azote.

A défaut de cuve à mercure bien pratique, car elle permet, répétons-le, à l'aide d'une série d'éprouvettes de procéder en même temps à de nombreux dosages, on emploiera le nitromètre classique de Lunge, dont on pourra faire établir un modèle très réduit et spécialement adapté à la mesure de faibles volumes de gaz.

B. *Cas des liquides.* — Si l'échantillon est *liquide*, on le traitera directement par le sous-acétate de plomb et on se trouve ramené au cas précédent.

CHAPITRE III

Applications pratiques. Recherches des nitrates dans le lait, dans les végétaux, les aliments et dans les organes.

Nous avons tout d'abord vérifié l'exactitude de la méthode que nous avons employée en utilisant une solution d'azotate de soude à 66 grammes par litre, dont nous prélevons 1 centimètre cube correspondant à 0 gr. 0419 d'anhydride azotique (N^2O^5) que nous évaporons à sec au bain-marie; le résidu est repris par l'acide sulfurique suivant le procédé décrit et agité avec du mercure.

Voici les résultats de cinq vérifications. On voit que la méthode se vérifie à 2 pour 100 près :

Volume AzO dégagé	Température	Pression	Volume de AzO 0° et 760mm	Volume d'azote correspondant	N^2O^5
18cc	16°	760	17cc	8cc50	0gr04114
18	17	760	16 90	8 45	0 04089
18	18	755	16 89	8 445	0 04087
18	18	755	16 89	8 445	0 04087
18	16	753	16 84	8 42	0 04075
	Moyenne.....		16 90	8 45	0 0409
	Théorie.....		17 34	8 673	0 041
		Différence.....		0 22	

1 cmc. d'azote à 0° et 760 mm. correspond. 0 gr. 00484 de N^2O
N^2O^5 introduit..... 0 gr. 0419
N^2O^5 retrouvé..... 0 gr. 0409

Cas particulier du lait ; recherche et dosage de nitrates dans le lait.

1° *Recherche.* — On peut qualitativement reconnaître la présence des nitrates dans le lait, en traitant par la diphénylamine en solution sulfurique le liquide obtenu après séparation du coagulum au métaphosphate de soude, ainsi que nous le disons à propos du dosage. On prend dans un tube à essai 3 centimètres cubes d'acide sulfurique concentré, III gouttes de diphénylamine sulfurique (1) et quelques gouttes du liquide filtré ; on obtient la coloration bleue caractéristique de la présence de nitrates.

2° *Dosage.* — Avant d'appliquer la réaction de transformation du nitrate en bioxyde d'azote, il est nécessaire d'éliminer du lait les matières albuminoïdes et le beurre ; pour cela on traite 20 centimètres cubes du lait par 6 centimètres cubes d'une solution à 5 % de métaphosphate de soude (cette solution doit être faite à froid en agitant fréquemment ; la dissolution est lente) puis on dilue avec 60-70 centimètres cubes d'eau en présence de 0 cmc. 8 d'acide acétique et 1 cmc. 2 d'acide sulfurique décinormal, on complète à 100 centimètres cubes ; après filtration et lavage on élimine les chlorures par 6 centimètres cubes d'une solution à 1 % de sulfate d'argent dont l'excès ne gênera pas le dosage ultérieur.

Nous avons effectué la recherche des nitrates dans le lait de vache, sur différents échantillons prélevés

1. Voir p. 13 en note.

par nous sur des vaches que nous avons vu traire et présentant ainsi toutes les garanties de pureté nécessaires.

Voici les résultats de nos expériences :

EXPÉRIENCES	AzO dégagé	Température	Pression	Volume AzO à 0° et 760 mm.	Volume d'azote correspondant	N^2O^5 par litre
	cc.		mm.	cc.	cc.	gr.
I. 20 cc. de lait n° 1 coagulés par le métaphosphate de soude et sulfate d'argent.	0,7	16°	757	0,671	0,335	0,081
II. 20 cc. de lait n° 2 même traitement que ci-dessus.	0,7	16°	757	0,671	0,335	0,081
III. 20 cc. de lait n° 3 traités comme ci-dessus.	0,6	16°	757	0,572	0,286	0,069
IV. 20 cc. de lait n° 4 même traitement que ci-dessus.	0,7	16°	757	0,671	0,355	0,081
Contrôle 20 cc. de lait n° 1 additionnés de 0 gr. 066 de nitrate de soude, puis traités comme précédemment.	18,1	16°	760	17,00 pour le lait seul 0,671	0,335	0,081

Pour le 0 gr. 066 de nitrate introduit dans le lait :

AzO corrigé	Volume d'azote correspondant	N^2O^5 correspondant
16 cmc. 33	8,16	0 gr. 0393
La théorie exige.....		0 gr. 0419
Différence.....		0 gr. 0026

L'approximation est donc de 6,2 0/0.

Toutefois, cette présence des nitrates dans le lait de vache n'est pas constante car deux autres échantillons de lait de vache examinés ne contenaient pas de nitrates.

Expérience sur d'autres échantillons de lait de vache.

	Résultat
1° 20 cmc. de lait n° 5 coagulés par le métaphosphate de soude et sulfate d'argent, puis examinés à la diphénylamine sulfurique.	Néant.
2° 20 cmc. de lait n° 6 traités et examinés comme précédemment.	Néant.

Il serait intéressant de reprendre la question et de chercher la loi qui règle la présence des nitrates. Quoiqu'il en soit, les proportions de nitrates trouvées dans le lait de vache, sont de nature à dépasser les proportions de nitrates que l'on trouve dans la plupart des eaux potables 0,020 à 0,040 par litre, c'est-à-dire qu'il ne paraît pas que le mouillage du lait puisse être révélé par le dosage des nitrates.

Lait de femme

EXPÉRIENCES	AzO dégagé	Température	Pression	Volume AzO à 0° et 760	Volume d'azote correspondant	N^2O^5 par litre
			mm.	cc.	cc.	gr.
Lait n° 1 14 cc. coagulés par le métaphosphate de soude	1,25	21°	752	1,14	0,57	0,193
Lait n° 2 2e échantillon, 20 cc. traités comme précédemment mais additionné de sulfate d'argent.	1,3	20°	760	1,2	0,6	0,145
Contrôle 20 cc. de lait n° 2 additionnés de 0 gr. 066 de nitrate de soude. Même traitement.	18,6	20°	760	17,43 pour le lait seul 1,2	0,6	0,145

Pour le 0 gr. 066 de nitrate introduit dans le lait :

AzO corrigé	Volume d'azote correspondant	N^2O^5 correspondant
cc.		gr.
16,23	8,11	0,0392
La théorie exige..		0,0419
Différence		0,0027

L'approximation est donc de 6,3 pour 100.

NITRATES DANS LES VÉGÉTAUX

Au point de vue bibliographique rappelons les travaux commencés et complétés par Lutz (*Bull. Soc. Bot. Fr.* t. LV, 1908, p. 104). Lutz rappelle que :

La présence des nitrates en excès dans les tissus des plantes a été signalée pour la première fois par Stahl en 1747. Depuis lors d'assez nombreux auteurs ont apporté leur contribution à cette étude et, successivement, on voit citer comme nitratifères : les Amarantes, les Pommes de terre, la Fumeterre, la Betterave, certain Crucifères, le Tabac, le Grand soleil, etc... Arnaud et Padé (1) avaient mentionné les Borraginées, les Solanacées, les Urticacées et les Chénopodiacées.

Berthelot (2), puis Berthelot et André (3) effectuant l'analyse par la méthode de Schloesing, donnent une longue liste de plantes appartenant aux groupes les plus divérs et qui toutes renferment des nitrates. Sur cette liste figurent non seulement des Phanérogames, mais encore des Cryptogames : Mousses, Equisétacées et Fougères.

Capus (4) poursuivant l'étude microchimique de

1. *Recherche chimique de l'acide nitrique, des nitrates dans les tissus végétaux.* C. R., t. XCVIII, 1884, I, p. 1488.

2. *Sur la présence universelle des azotes dans le régime végétal.* C. R., t. XCVIII, 1884, I, p. 1506 (*Journal de Ph. et Ch.*, 5e s., t. X., 1884, II, p. 89).

3. *Recherche sur la végétation* (*Journal de Ph. et Ch.*, 5e s., t. X, 1884, II, p. 444).

4. *Sur la répartition et la migration des nitrates dans les tissus de la plante* (*Ann. agr.*, t. XII, 1886, p. 24).

diverses espèces au moyen de chlorhydrate de cinchonamine a localisé les nitrates accumulés dans vingt-six d'entre elles et en cite une vingtaine d'autres ne contenant pas de ces substances.

Lutz (1) examine cette question pour les plantes parasites et saprophytes.

Tous ces travaux tendent à la même conclusion : présence constante de nitrates dans presque toutes les plantes, phanérogrames ou cryptogames, indépendantes ou parasites, au moins à certaines époques de la végétation.

Les nitrates sont susceptibles de se transformer en nitrites, par réduction sous diverses influences : action de la chlorophylle (Schloesing fils), action des bactéries (Jorissen), vie anaérobie (Laurent).

En resumé, les plantes, à quel groupe qu'elles appartiennent et en vie normale, accumulent des nitrates en proportions variables dans leurs tissus.

Nos recherches vont montrer que dans les végétaux entrant dans notre alimentation, nous n'avons pas, contrairement, à ce que nous attendions, trouvé de nitrates.

Voici en effet, les résultats de nos expériences :

Betterave fourragère (examinée en 1926).

Humidité.....	86 %
Résidu sec.....	14 %

1. Sur l'accumulation des nitrates dans les plantes parasites et saprophytes et sur l'influence de la diphénylamine sulfurique comme réactif microchimique de ces substances. *Bull. Soc. Bot. Fr.*, t. LV, 1908, p. 104.

Le produit est réduit en pulpe, 25 grammes de pulpe fraîche, sont traités ainsi qu'il est indiqué page 22.

Les résultats sont négatifs (1).

Betterave fourragère (examinée par M. Kohn-Abrest, en mai 1923.

Betterave de Leuilly (Aisne) Az^2O^5, 2,6 pour 1.000.

Betterave de Ferny N^2O^5 2,2 pour 1.000.

Bourrache sèche : nitrate (néant).

(Ce végétal est indiqué comme contenant des nitrates en abondance.)

RECHERCHES DES NITRATES DANS DIVERS ALIMENTS VÉGÉTAUX

Nos expériences nous ayant montré que le lait de femme renferme des nitrates, nous avons cherché à en connaître l'origine et nous avons analysé quelques-uns des aliments d'origine végétale, tels que : farine, pain, lentilles, épinards, artichauts, vin ; les résultats se sont montrés négatifs. (Pour le détail de recherche, voir p. 22 et 23.)

Nitrates dans les viandes, charcuteries ou salaisons.

On sait que l'addition du salpêtre donne aux salaisons la coloration rouge qui leur est particulière. Le dosage de nitrates dans ces produits pré-

1. L'essai à la diphénylamine sulfurique du produit destiné finalement à être traité par l'acide sulfurique a conduit à des résultats négatifs.

sente donc de l'intérêt. Voici comment on effectuera ce dosage :

On met en macération 50 grammes du produit finement pulpé, dans 100 centimètres cubes d'eau distillée additionnée de carbonate de soude, et l'on poursuit la recherche comme il est dit page 22.

Aucune trace de nitrates n'a été retrouvée dans la viande de bœuf, de veau et de mouton.

Charcuterie. — Nous avons examiné des saucissons genre mortadelle et du lard fumé.

Des quantités très notables de nitrates ont été relevées provenant du salpêtrage.

Le résultat des expériences est le suivant :

	AzO dégagé	Température	Pressions	Volume AzO à 0° et 760 mm.	Volume d'Azote correspondant	N^2O^5 par kilo
I. 50 gramme lard.	8,2	16	757mm	7,6	3,8	0 gr.367
II 50 gr. saucisson.	9,00	16	757mm	8,4	4,2	0 gr.406
					4,00 moyenne	

En résumé, l'alimentation habituelle n'apparaît pas comme devant être la cause d'introduction de nitrates dans l'organisme, sauf en ce qui concerne les charcuteries salpêtrées.

L'eau potable contient des quantités de nitrates assez variables soit de 0 gr. 020 à 0 gr. 040 de N^2 O^5 par litre. Mais ces quantités sont insuffisantes pour

expliquer la présence de 0 gr. 081 d'anhydride azotique par litre de lait de vache. Il y aurait, en ce qui concerne l'origine de cette présence des recherches intéressantes à poursuivre.

CHAPITRE IV

Recherche des nitrates en toxicologie

Recherche dans les viscères. — La recherche de l'acide nitrique proprement dit, en toxicologie, lorsqu'il s'agit de quantités assez fortes, n'offre pas de difficultés ; celle des petites quantités d'acide nitrique ou de nitrates par contre est délicate. On pourra l'effectuer de la manière suivante (1) :

Les matières bien divisées sont mises à macérer pendant quelque temps dans l'eau distillée, on filtre, on lave à l'eau le résidu sur le filtre. Les liqueurs sont additionnées de carbonate de soude, pour neutraliser les acides libres s'il en existe et transformer en azotate de soude les azotates de chaux, de magnésie, etc...

On traite par le sous-acétate de plomb jusqu'à ce qu'il ne se forme plus de précipité, on fait bouillir pour mieux rassembler le précipité et on filtre. L'excès de sel de plomb est enlevé par addition du carbonate de soude, on filtre à nouveau, le carbonate de soude en excès est neutralisé par l'acide acétique.

Le liquide évaporé à siccité sous pression réduite,

1. Ogier et Kohn-Abrest, *Traité Ch. tox.*, t. II, p. 11.

donne un résidu qui est repris par l'alcool absolu qui enlève à son tour l'acétate de soude et diverses impuretés. Enfin, sur le résidu contenant éventuellement le nitrate de soude, on effectuera la recherche des nitrates par la diphénylamine comme il a été indiqué ci-dessus (voir p. 26 et 13 en note), et pour le dosage on reprend le résidu à l'acide sulfurique, on introduit dans une éprouvette sur le mercure, on agite, mesure et on analyse du gaz recueilli, etc.

Cette recherche des nitrates ne donne de résultats probants que si elle est effectuée très rapidement sur des viscères non putréfiés.

Rappelons à ce propos que M. Carlos Ghilgliotto a également constaté (1) que l'acide nitrique même très étendu laissait sur les tissus des traces pouvant être identifiées directement comme les traces (Xanthoprotéiques) que laisse l'acide concentré.

Voici ses expériences :

« Dans un estomac on place un peu d'acide « nitrique au 1/5, on le laisse vingt minutes en con- « tact, et on lave à l'eau courante durant le même « temps. Des fragments de la paroi prélevés et pla- « cés dans une capsule, mis en contact avec le réac- « tif à la diphénylamine ont donné la coloration « bleue intense après quelques minutes.

« On obtient les mêmes résultats avec l'acide « nitrique au 1/10, au 1/100, au 1/1000.

« De plus, en râclant avec un scalpel les tartres

1. Ghilgliotto, *Ann. Méd. lég.*, 1924, t. IV, p. 11.

« jaunes que produit l'acide nitrique sur les ongles « et sur la peau et en les soumettant au traitement « précédent on obtient également la réaction de « de l'acide nitrique.

« Le réactif à la brucine, expérimenté de façon « semblable ne donne pas de bons résultats. »

L'essai à la diphénylamine peut être effectué sur le sérum sanguin directement. Voici quelques détails donnés par Etienne Martin et Valendru (1) :

« Le mode opératoire est très simple. Pour le « sérum sanguin, il suffit de mettre quelques cen- « timètres cubes de sérum dans un tube à essai, « ajouter un centimètre cube de réactif à la dyphé- « nylamine, puis laisser glisser le long des parois « du tube un centimètre cube d'acide sulfurique « qui tombe au fond. A la limite de séparation des « deux liquides apparaît un disque bleu intense qui « caractérise les nitrates.

« Pour les poumons et les voies respiratoires, il « suffit d'ajouter dans quelques centimètres cubes « d'eau distillée un fragment d'organe et d'opérer « comme pour le sérum, un disque bleu caracté- « ristique des nitrates apparaîtra».

En opérant ainsi sur les poumons et voies respiratoires d'un cobaye non intoxiqué, les auteurs n'ont pas trouvé de nitrates, tandis qu'ils en ont constaté sur les mêmes organes d'un cobaye intoxiqué.

Au cours de notre travail, nous avons recherché

1. *Annales Médecine légale,* 1924, p. 442.

les nitrates par les procédés décrits ci-dessus dans les viscères d'un cadavre mis à notre disposition par M. Kohn-Abrest ; cette recherche s'est montrée négative.

Il en a été de même dans les expériences de même nature que nous avons réalisées sur des viscères d'animaux de boucherie (poumons de veau, cœur de bœuf et reins de mouton).

D'autre part, nous avons constaté que les viscères d'un cobaye intoxiqué par du *nitrite* de soude ne contenait aucune trace de nitrate. Ces derniers n'apparaissent donc pas comme le terme d'une transformation de produits azotés dans l'organisme.

Doit-on plutôt admettre l'hypothèse inverse ? C'est-à-dire, une transformation des nitrates en nitrites ? Nous ne nous prononcerons pas encore à ce sujet, bien qu'on ait constaté une transformation des nitrates en nitrites dans l'urine.

Présence des nitrates dans l'urine. — L'urine normale, d'après Schloesing, renferme de faibles quantités de nitrates ; ces nitrates se transformeraient peu à peu en *nitrites* lorsque l'urine est abandonnée à elle-même.

M. Caron (1) a eu recours pour la recherche des nitrates dans l'urine aux trois procédés suivants :

1° La méthode de Schloesing ;

2° La méthode de Busch au nitron ;

3° La méthode colorimétrique à la diphénylamine.

Les deux premières méthodes sont, soit d'une

1. *Ann. Ch. analytique*, 1912, t. XVII, p. 9.

exécution difficile, soit gênées par des matières organiques et les chlorures ; et dans le cas de la méthode de Busch par l'instabilité du nitron.

Le procédé à la diphénylamine, susceptible d'après l'auteur de permettre un dosage colorimétrique, présente sur les autres l'avantage d'être facile, rapide et de n'exiger que quelques centimètres cubes d'urine.

Les urines examinées par M. Caron, contenaient, en général, de 100 à 200 milligrammes par litre d'azotates évalués en nitrate de potasse, dans quelques échantillons la dose s'élevait jusqu'à 300 et 400 milligrammes, dans d'autres par contre, elle s'abaissait à quelques milligrammes seulement par litre.

De notre côté, nous avons recherché dans une urine humaine (provenant d'un sujet en bonne santé) la présence des nitrates.

On traite 100 centimètres cubes d'urine par 10 centimètres cubes de sous-acétate de plomb, après repos et filtration, l'excès de plomb est éliminé par le carbonate de soude. On filtre à nouveau, puis on neutralise par l'acide acétique, on évapore sous pression réduite. Sur le résidu, nous avons constaté la présence de nitrate par la réaction à la diphénylamine sulfurique.

Ensuite le dosage, pratiqué par la méthode gazométrique citée plus haut (p. 22), nous a donné une teneur en *nitrate de soude* par litre de 60 milligrammes.

CONCLUSION

1° L'application du principe de la méthode de Lunge (procédé Kohn-Abrest) à la recherche et au dosage de très petites quantités de nitrates en chimie biologique, permet de résoudre facilement ces déterminations jusqu'alors très délicates.

2° Ce procédé de recherche montre que les nitrates n'existent pas normalement dans les aliments d'origine végétale que nous avons examinés.

3° Nous n'avons trouvé aucune trace normale de nitrates dans les viscères de l'homme ou des animaux. La chair de ces derniers (bœuf, veau, mouton) n'en contient pas.

Seul le lait (lait de femme et de vache) peuvent contenir des nitrates en proportions : de (0 gr. 080 à 0 gr. 180, 0 gr. 190 de N^2O^5) par litre de lait de femme ou de lait de vache.

L'urine contiendrait également des proportions de l'ordre de celles que l'on trouve parfois dans le lait.

4° Il serait intéressant d'étudier rationnellement la présence des nitrates dans le lait afin d'en fixer l'origine ; mais, dès maintenant, il n'apparaît pas que cette présence puisse être retenue comme l'in-

dice d'un mouillage du lait, étant donné que les proportions de nitrate du lait sont généralement très supérieures à celles des eaux potables.

5° Par suite de l'absence de doses notables de nitrates dans l'alimentation courante, la présence d'environ 200 milligrammes de nitrates par litre de lait, ne s'explique pas par un apport alimentaire.

On sait que les nitrates sont des diurétiques puissants, que l'organisme n'accumule pas. On est donc amené à supposer que l'organisme peut élaborer quotidiennement de petites quantités de nitrates, éliminées complètement par les reins ou les glandes mammaires.

6° La recherche toxicologique des nitrates par notre procédé donne des résultats très satisfaisants. Mais ainsi que l'a montré M. Ghilgliotto, cette recherche doit être effectuée très promptement en raison des altérations des nitrates sous l'influence de la putréfaction.

Vu : bon à imprimer:
le Président de la thèse,
M. GUERBET
17 juin 1926

Vu : Le Doyen de la Faculté,
RADAIS

Vu et permis d'imprimer :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
P. LAPIE

7232 — Impr. de la Faculté de Médecine, Jouve et Cie, 15, rue Racine, Paris — 6 1926